CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN MEDIOS NO ACUOSOS: APLICACIÓN A LA OBTENCIÓN DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS PARA ALIMENTACIÓN

Excmo. Sr. Presidente,
Ilmos. Sras. Y Sres. Académicos,
Sras. Y Sres.:

Quiero manifestar en primer lugar mi gratitud a los miembros de la Academia Canaria de Ciencias por el alto honor que me hacen al aceptar mi ingreso como Académico Correspondiente de la misma. Muchos de ellos, han sido compañeros y maestros míos al mismo tiempo, durante mi primera etapa como Profesor de Universidad, etapa de la que guardo un recuerdo entrañable y que añoro con frecuencia. Me gustaría mencionar, por el mayor trato que tuve con ellos, a Don Agustín Arévalo Medina y Don Nacere Hayek Calil, ambos fueron mis Decanos en esta primera época, pero sobre todo fueron mis amigos ayudándome con sus consejos y fundamentalmente con su ejemplo, a Don Benito Rodríguez Ríos y Don Enrique Fernández Caldas, que fueron mis Rectores y con los que colaboré en muchas ocasiones agradables y también en algunos momentos difíciles, a Don Antonio González González, que ya en aquella época dirigía uno de los Departamentos de Química Orgánica más prestigiosos del País y con cuya ayuda conté siempre, al resto de mis compañeros de Químicas: Dª Conchita Sánchez Pedreño, primero, y cuando se reincorporó a su vuelta del País Vasco Don Francisco García Montelongo y a tantos otros amigos de Químicas, de otras Licenciaturas e incluso del Consejo de Investigaciones Científicas, como Don José Bretón Funes, con los que mantuve contacto cuando casi toda la Universidad de La Laguna cabía en el viejo recinto universitario de San Fernando de La Laguna.

Recuerdo ahora, la comida de despedida que me organizó la Facultad, era yo Decano en aquel momento, a la que asistieron Los Sabandeños entre los que tenía algunos buenos amigos, debido a la emoción prácticamente no pude decir las palabras que tenía preparadas y Los Sabandeños improvisaron una estrofa que nunca olvidaré:

" El canario es generoso
con el que viene de allá
da su vida en esta tierra
y llora cuando se va "

porque si bien es cierto que trabaje a fondo durante mi estancia en la Universidad de La Laguna, también lo es que Canarias me ha compensado de sobra.

También quiero expresar mi agradecimiento al Profesor Dr. Federico Díaz Rodríguez, no solo por tener la iniciativa de proponer a la Academia mi designación y llevar a cabo mi presentación en este Acto de Ingreso como Académico Correspondiente, sino porque con su colaboración y la del Profesor Dr. Sebastián Delgado Díaz, conseguimos iniciar en esa primera etapa que he comentado anteriormente el desarrollo del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de La Laguna, una etapa en la que faltaban los medios pero sobraba la ilusión, aunque probablemente esto sea una visión subjetiva, consecuencia de la edad, quiero creer que los jóvenes Doctores que inician hoy su trabajo docente e investigador tienen la misma ilusión que teníamos nosotros en aquellos momentos y que seguimos tratando de mantener, sin conseguirlo en muchos momentos, porque sabemos que la ilusión es necesaria para el trabajo bien hecho.

Dicho esto, voy a entrar en el tema de la conferencia que he preparado con la intención de explicarles brevemente una de las ultimas líneas de investigación en la que estoy trabajando, los Profesores solemos encontrarnos mas a gusto hablando de un tema científico que de sentimientos como anteriormente, pero les prometo que trataré de no cansarles.

CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN MEDIOS NO ACUOSOS

Desde el trabajo pionero de Zaks y Klibanov publicado en 1984 en la revista Science, se han publicado muchos trabajos de investigación sobre las posibilidades de utilización práctica de enzimas en medios no acuosos, o mejor dicho microacuosos, porque una pequeña cantidad de agua, ligada a la enzima, es siempre necesaria para mantener la actividad enzimática.

En este trabajo con lipasa pancreática porcina, una enzima muy bien estudiada y que se caracteriza por la amplia gama de sustratos sobre los que puede actuar, utilizando una solución 2 M de n-heptanol en tributirina, encuentran que la velocidad de alcoholisis, cambia con el contenido en agua de la mezcla de sustratos en la forma que se indica en la figura 1, en la que se observa que la enzima es activa incluso con un contenido en agua del sistema, sustratos más enzima, inferior al 0.02 % en peso, aunque su máxima actividad para la reacción citada la presenta a un contenido en agua del orden de 0.8 % en peso.

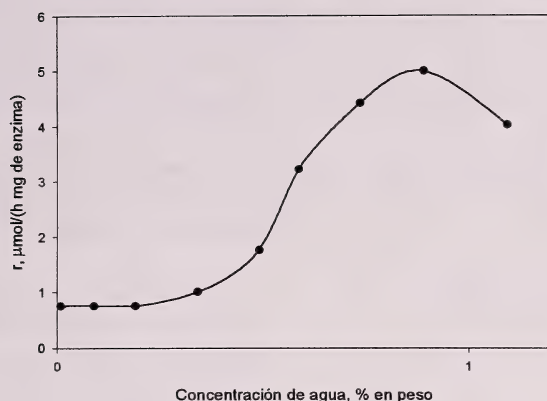


Figura 1

También analizan los autores citados, la estabilidad térmica de la enzima a 100 °C, una temperatura a la que la esta lipasa pancreática en disolución acuosa se desnaturaliza completamente en tiempos del orden de 1 segundo, los resultados obtenidos se indican en la figura 2, para dos contenidos en agua del sistema: 0.02 y 0.8 % en peso. Puede observarse en esta figura que la estabilidad térmica de la enzima aumenta considerablemente, sobre todo para el contenido en agua menor para el que resulta una vida media de la enzima a 100 °C, superior a 12 horas.

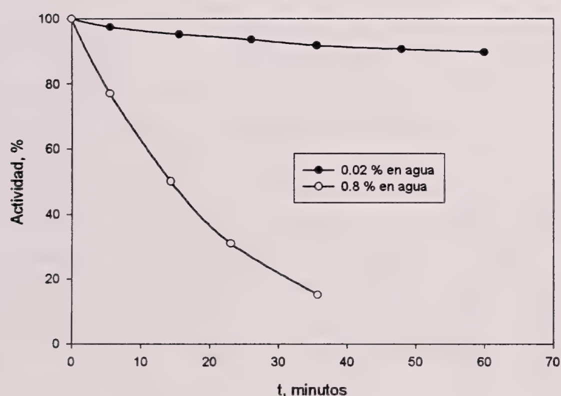


Figura 2

Resultados parecidos a los indicados en la figura 1 para la alcoholisis de tributirina con n-heptanol se obtienen con otros alcoholes primarios y secundarios, sin embargo para los alcoholes terciarios ensayados, la enzima seca (0.02 % en agua) resulta inactiva, mientras que la enzima húmeda (0.8 % en agua) sigue siendo activa.

Otro resultado interesante comunicado por estos autores en un trabajo posterior (1985) indica que cuando la lipasa pancreática porcina se precipita desde su disolución acuosa, a diferentes pHs, con acetona y posteriormente se seca a vacío, el polvo de lipasa obtenido puede resuspenderse en agua a pH = 8.4, que es su pH óptimo, y medir la velocidad de hidrólisis de tributirina, línea A de la figura 3, por supuesto el pH de la precipitación previa no tiene ninguna influencia, se ha "olvidado", y la enzima actúa siempre a su velocidad máxima. Por el contrario, cuando el polvo de lipasa obtenido se resuspende en la solución 2 M de n-heptanol en tributirina y se mide la velocidad de alcoholisis a 20 °C, los resultados obtenidos son los que indica la línea B de la figura 3, que pone de manifiesto que la enzima "recuerda" el valor del pH al cuál fue precipitada de una disolución acuosa. Al encontrarse en un medio hidrófobo, mantiene la

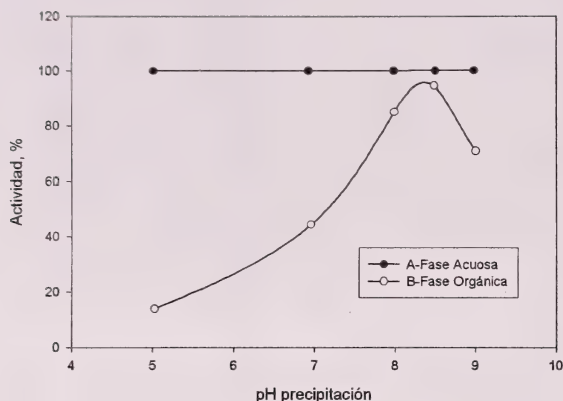


Figura 3

configuración y el estado de protonización de sus grupos polares, que tenía en el momento de ser precipitada. Si lo fue a su pH óptimo,la configuración de su centro activo y el estado de protonización de los grupos polares que intervienen en la catálisis será el óptimo.

Esta mayor rigidez de la proteína enzimática puede explicar perfectamente, como indican estos investigadores, su mayor estabilidad térmica y su inactividad frente a alcoholes terciarios que por su estructura pueden requerir una mayor flexibilidad del centro activo para aceptarlos como sustratos.

Después de estos trabajos pioneros hace ya 15 años, la catálisis enzimática en ambientes microacuosos ha progresado mucho, fundamentalmente con lipasas, ya que por la naturaleza de los sustratos sobre los que actúan estas enzimas están adaptadas a ejercer su acción catalítica en una interfase fase acuosa-fase orgánica. Hoy día, se dispone de lipasas inmovilizadas; por adsorción generalmente, sobre soportes macroporosos, dado que el tamaño de estas enzimas oscila generalmente alrededor de 50 Å, y debe preverse que la enzima junto con su agua ligada recubra la superficie del soporte, permitiendo además que exista en los poros un canal de fase orgánica que permita acceder a los sustratos hidrófobos hasta el centro activo de la enzima. En muchos de los procesos de interés industrial, como veremos más adelante, estos sustratos son moléculas relativamente voluminosas como triacilgliceroles.

Así, las lipasas inmovilizadas, en medios microacuosos, están siendo utilizadas para la síntesis de ésteres entre ácidos grasos y monoalcoholes, que forman parte de aromas naturales para su empleo como aditivos alimentarios y con fines cosméticos y farmacéuticos. La cinética de estos procesos se interpreta frecuentemente utilizando los mismos modelos de la cinética enzimática en disolución acuosa. Así, Chulalasananukul y cols. (1990) estudian la esterificación de ácido oleico con etanol utilizando una lipasa inmovilizada de *Mucor miehei* y n-hexano como disolvente, sus resultados se ajustan a un mecanismo Ping-Pong con inhibición competitiva de etanol. Un resultado semejante obtienen Ramamurthi y McCurdy (1994) en la esterificación de ácido oleico con metanol en n-hexano utilizando una lipasa inmovilizada de *Candida antarctica,* aunque en este caso la inhibición del metanol es más intensa. Pero la inhibición del alcohol deja de observarse cuando aumenta la magnitud molecular del mismo, como encuentran Yong y Al-Duri (1996) en la esterificación de ácido oleico con octanol.

También se están utilizando para la fabricación de lípidos estructurados, pero de esto hablaremos más adelante.

Sin embargo, quedan por explicar muchos aspectos importantes, como la influencia de la concentración de agua, con la dificultad añadida de distinguir entre el agua ligada a la enzima y el agua libre, en sistemas en los que la concentración de este reactivo es extremadamente pequeña y fundamentalmente la influencia del solvente orgánico cuando se utiliza, ya que puede ser necesario para disminuir la viscosidad de la mezcla reaccionante o para utilizar las concentraciones óptimas de los reactivos.

La naturaleza heterogénea de estos sistemas, determina que fenómenos físicos puedan influir de forma apreciable sobre la cinética observada de la reacción. Por ejemplo, Chulalasananukul y cols. (1990), encuentran la influencia del contenido en agua sobre la velocidad inicial de reacción que se indica en la figura 4, con un máximo para una relación masa de agua/masa de enzima inmovilizada de 0.10 y anulándose por completo para un valor de esta relación de 0.5 a 0.6. Nuestros cálculos con el mismo soporte macro-poroso utilizado por estos autores, figura 5, indican que con el primer valor si el agua se distribuye uniformemente junto con la proteína sobre la superficie del soporte todos los poros de tamaño adecuado para que penetre en ellos la enzima permitirán el acceso de la fase hexánica y por tanto de los reactivos hidrófobos disueltos en la misma, mientras que para un valor de 0.6 de la relación masa de agua/masa de enzima inmovilizada, el agua rellenará por completo los macroporos e incluso formará una delgada película sobre la superficie externa de las partículas de enzima inmovilizada que impedirán el contacto de la enzima con los reactivos. La actividad ha sido medida para la acidolisis de trioleina con ácido caprílico y los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la entrada del agua en la estructura porosa del catalizador y el consiguiente desplazamiento de la fase hexánica es

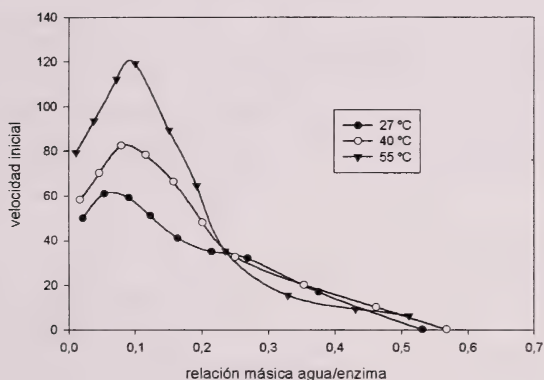


Figura 4

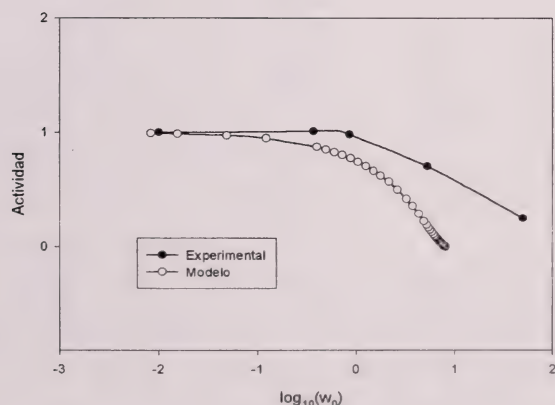


Figura 5

una de las razones fundamentales de la disminución de la velocidad de reacción al aumentar el contenido en agua.

Por otra parte, aunque todos los investigadores citados toman las precauciones necesarias para evitar el establecimiento de gradientes de concentración externos a las partículas, incrementar el grado de agitación de la dispersión enzima-fase orgánica hasta que este no influye en la velocidad de reacción observada, no es posible asegurar lo mismo con respecto al establecimiento de gradientes de concentración en el interior de las partículas, ya que es difícil preparar lotes de enzima inmovilizada con diferentes tamaños de partícula del soporte y la misma actividad por unidad de masa de enzima inmovilizada.

El hecho de que la inhibición del alcohol se haya observado solo cuando estos son de pequeño tamaño molecular, es decir, más hidrófilos y de que la intensidad de esta inhibición aumente al hacerlo el carácter hidrófilo del alcohol, podría indicar que la disminución de la velocidad de reacción observada es debida en parte al cambio del carácter de la película de agua esencial que rodea a la proteína enzimática debido a la penetración en la misma de los reactivos hidrófilos y en parte al aumento del volumen de esta fase que ejercería el mismo fenómeno de desplazamiento comentado anteriormente.

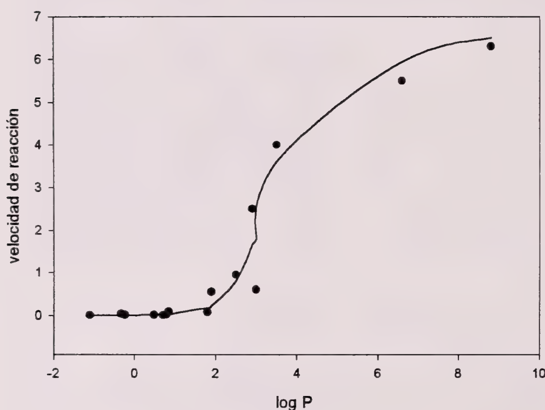


Figura 6

Un resultado semejante se ha obtenido al analizar la influencia de la naturaleza del solvente orgánico sobre la velocidad de una reacción enzimática en medios microacuosos. En este sentido el carácter hidrófobo del solvente parece ser la variable más influyente, como se observa en la figura 6 debida a Laane y cols. (1987) utilizando los resultados de Zaks y Klibanov (1985) para la reacción entre tributirina y heptanol, catalizada por una lipasa de *Candida cylindracea,* esta figura pone de manifiesto que parece existir relación entre la velocidad de reacción observada y el log P del solvente orgánico utilizado. P es el coeficiente de partición del solvente orgánico entre octanol y agua a 25 ºC y dilución infinita, muy utilizado para correlacionar los efectos biológicos de las sustancias orgánicas y que puede considerarse como una medida del carácter hidrófobo de las mismas. Estos autores llegan a establecer como regla que la biocatálisis es baja en disolventes orgánicos con valores de $\log P < 2$, moderada en disolventes con $2 < \log P < 4$ y alta si $\log P > 4$. Este resultado suele explicarse por el hecho de que los solventes parcialmente hidrófilos, $\log P < 2$, son capaces de retirar de la enzima el agua esencial para mantener su actividad catalítica, o se distribuyen entre ambas fases aumentando el volumen de la fase acuosa.

Pero este parámetro, log P, no permite explicar todos los resultados obtenidos, ni siquiera una parte importante de ellos. En este sentido, es interesante considerar los resultados obtenidos por Valivety y cols. (1991) en la esterificación de decanoico con dodecanol catalizada por lipasa pancreática porcina en 20 solventes orgánicos. Estos autores utilizando reactivos saturados de agua miden la velocidad inicial de reacción y la constante aparente de equilibrio y obtienen los resultados que se indican en la Tabla 1. La reacción considerada es:



Decanoico + Decanol ↔ Ester + Agua

dado que se parte del solvente y los reactivos saturados de agua, la concentración de esta última se considera constante y la constante de equilibrio se calcula mediante la expresión:

$$K_0 = \frac{[Ester]}{[Decanoico][Dodecanol]}$$

Tabla 1

Solvente	Velocidad inicial µmol/(s kg de catalizador)	Constante de equilibrio L/mol
Nitrometano	37	65
Dietil-cetona	6.3	1.8
Dietil-eter	20.7	18
Metil-isobutil-cetona	9.0	5.1
Diclorometano	9.4	19
Tricloroetileno	28.5	1000
Bromoetano	37	220
Diisopropil-eter	56	17
Benceno	54	330
Cloroformo	6.3	150
Tolueno	61	610
1,1,1-Tricloroetano	98	590
Di-n-butil-cetona	36	24
Tetracloruro de carbono	101	730
Dietil-ftalato	76	11
n-Hexano	143	700
Benzoato de bencilo	62	82
Isooctano	124	1600
Dibutil-ftalato	86	31
n-Hexadecano	166	670

La posición del equilibrio debe ser independiente de la enzima y vendrá determinada sólo por las interacciones entre el disolvente y los reactivos y productos de la reacción. Es decir, habrá una constante de equilibrio distinta para distintos disolventes o fases, naturalmente solo si la constante de equilibrio se expresa en concentraciones. Sin

embargo, la variación de tres ordenes de magnitud observada en la tabla 1 para Ko no puede ser explicada fácilmente. Si el valor de Ko se corrige utilizando la concentración de agua correspondiente a la saturación del solvente, la variación se reduce a dos ordenes de magnitud, pero incluso utilizando los coeficientes de actividad calculados mediante las contribuciones de grupos atómicos por el método UNIFAC, no es posible explicar la gran variación de la constante de equilibrio.

Tanto Halling (1990), como Valivety y cols. (1991), han tratado de correlacionar cuantitativamente la velocidad inicial y la posición del equilibrio con distintas propiedades del disolvente relacionadas con la polaridad (constante dieléctrica, solubilidad del agua en el disolvente, log P para el sistema octanol-agua, etc.) sin resultados aceptables. Sin embargo, estos autores no tiene en cuenta la posible dimerización del ácido en la fase orgánica, Camacho y cols. (1986), e incluso la posible hidratación del monómero y del dimero en la fase orgánica Fujii y Tanaka (1977), que suponen equilibrios simultáneos que determinan las concentraciones reales de las diferentes especies en la fase orgánica.

Para finalizar este apartado me gustaría destacar que a pesar de los aspectos aún pendientes para comprender la actuación de las enzimas en medios microacuosos, es evidente el extraordinario potencial de estos sistemas para la transformación de alimentos, como veremos a continuación, y en general para la síntesis de compuestos orgánicos, incluso de compuestos quirales.

LÍPIDOS ESTRUCTURADOS

Los lípidos desempeñan muchas funciones en los organismos vivos, no solo son la principal forma de reserva de energía metabólica sino que también son precursores de gran número de biomoléculas esenciales y los glucolípidos y fosfolípidos son los componentes principales de las membranas biológicas. La digestión de los triacilgliceroles de los alimentos tiene lugar principalmente en el intestino delgado por acción de los enzimas digestivos y de los ácidos biliares, los primeros catalizan la hidrólisis de los triacilgliceroles que tiene lugar en la interfase lípido-agua mientras los segundos actúan aumentando el área interfacial por su acción emulsionante. La lipasa pancreática cataliza la hidrólisis de los triacilgliceroles en sus posiciones extremas para formar 2-acilgliceroles, junto con las sales sódicas y potásicas de los ácidos grasos que colaboran en el proceso de emulsionar a los lípidos. La mezcla de ácidos grasos y monoacilgliceroles producidos por la digestión de los lípidos es absorbida por la mucosa intestinal en un proceso en el que intervienen también los ácidos biliares.

Los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs de PolyUnsaturated Fatty Acids) son compuestos orgánicos cuyas funciones en el organismo son principalmente como componentes de las membranas celulares y como precursores de biomoléculas esenciales. Los PUFAs se dividen en familias según la posición del primer doble enlace dentro de la cadena carbonada contando a partir del metilo terminal. Las dos familias más importantes tienen ese primer doble enlace en las posiciones 3 y 6, dando lugar a las llamadas series n-3 y n-6, respectivamente.

El grupo de ácidos grasos n-3 está constituido por los ácidos: α-linolénico (ALA, 18:3n3), estearidónico (SA, 18:4n3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3), y

docosahexaenoicò (DHA, 22:6n3). Todos se encuentran en proporciones importantes en aceites de origen marino, excepto el ácido α-linolénico, que además se encuentra también en los aceites de origen vegetal.

El grupo de ácidos grasos n-6 está constituido por los ácidos: linoleico (LA, 18:2n6), γ-linolénico (GLA, 18:3n6) y araquidónico (AA, 20:4n6). La fuente principal de estos PUFAs n-6 son las plantas.

Los PUFAs: LA (un n-6) y ALA (un n-3) son ácidos grasos esenciales (EFA de Essential Fatty Acid) ya que no pueden ser sintetizados en el organismo humano y éste únicamente puede obtenerlos a través de la dieta. Además, estos ácidos son los precursores del resto de los PUFAs de sus respectivas familias, encontrados en las células animales.

Además de su función como componentes de las membranas, los PUFAs tienen otras funciones de gran importancia fisiológica y bioquímica. Entre esas funciones destaca la síntesis de prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxanos y leucotrienos, que ejercen controles en diversos procesos metabólicos. Estos compuestos son eicosanoides y, por tanto, metabolitos de los PUFAs de 20 átomos de carbono como el AA (20:4n6), el eicosatrienoico (20:3n6) y el EPA (20:5n3).

En general, se entiende por lípidos estructurados los triglicéridos obtenidos por procesos químicos o enzimáticos con una determinada distribución de ácidos grasos en las diferentes posiciones de la glicerina, para conseguir una finalidad concreta. Dado que hasta el momento estas finalidades están dirigidas hacia la nutrición humana los aspectos más importantes son la naturaleza de los ácidos grasos constituyentes y su posición en la glicerina, distinguiendo entre las posiciones extremas (1 y 3) y la posición intermedia (2), ya que de acuerdo con el conocimiento actual, su absorción intestinal depende de estas posiciones.

Por la misma razón, de estar dirigidos hacia la nutrición humana, las materias primas utilizadas para su fabricación son triglicéridos naturales, de origen vegetal o animal, y los procesos utilizados generalmente enzimáticos, dada la estructura delicada de muchos ácidos grasos: PUFAs.

Lípidos estructurados al azar, constituidos por ácidos grasos de cadena larga (como el esteárico) y de cadena corta (como el acético, propiónico y butírico), ya se están adicionando a productos alimenticios, en un amplio rango de productos de repostería, por su carácter hipocalórico con respecto a los lípidos utilizados anteriormente. También se utilizan en alimentación clínica como triglicéridos de cadena media, TGM, ácidos grasos saturados del caproico al laurico, como aporte calórico en pacientes con insuficiencia pancreática y otros problemas de absorción de lípidos, ya que constituyen una fuente de energía inmediata y concentrada que es rápidamente absorbida, por que son más solubles en agua que los triglicéridos habituales y, a diferencia de estos, que parece ser que se absorben fundamentalmente a través del sistema linfático, los TGM se absorben a través de la vena porta, son rápidamente utilizados y es menos probable que se acumulen en el tejido adiposo. Como tales constituyen entre el 20 y el 50% de los lípidos totales presentes en dietas líquidas para pacientes hospitalizados que requieren alimentación enteral, así como en algunos productos nutricionales para pacientes con enfermedades crónicas (SIDA, fibrosis

cística), para ciertos pacientes operados de cancer, enfermos con politraumatismos, quemaduras y enfermedades renales o hepáticas.

Sin embargo, los TGM no contienen ácidos grasos esenciales y en los productos dedicados a nutrición enteral y parenteral han de utilizarse junto con triglicéridos con ácidos grasos esenciales de cadena larga, TGL, para suministrar una nutrición equilibrada. Pero cuando existen problemas de absorción de lípidos, las mezclas de estos triglicéridos no los solucionan, ya que ambos tipos de triglicéridos han de absorberse por separado, persistiendo los problemas de absorción de los TGL.

Así, en la actualidad se entiende por lípidos estructurados los triglicéridos que contienen ácidos grasos de cadena media y ácidos grasos de cadena larga en la misma molécula, con la finalidad doble de su contenido energético y como aporte de ácidos grasos funcionales para el tratamiento de enfermedades o para corregir determinadas carencias. De acuerdo con los conocimientos actuales, su distribución ideal es aquella en la que los ácidos grasos de cadena media ocupan las posiciones 1 y 3 de la molécula de triglicérido y los ácidos grasos esenciales y funcionales de cadena larga la posición 2 (estructura MLM). Investigaciones recientes han demostrado que la absorción de estos lípidos es más fácil que la absorción de las mezclas de TGM y TGL, siendo por tanto más útiles en el tratamiento de la mala-absorción de lípidos que las mezclas de ambos triglicéridos.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), como el EPA, el DHA y el AA están siendo objeto de una gran atención debido a su importante papel en la salud humana. El EPA se utiliza en el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares, desordenes del sistema inmunológico, inflamaciones, insuficiencias renales, alergias y cáncer. El DHA es importante en el desarrollo del sistema nervioso central de los niños, sobre todo en las primeras etapas tras el nacimiento, y se utiliza en la formulación de leches para niños prematuros. El AA es también un ácido graso esencial en la nutrición humana y un precursor biogenético de las prostaglandinas y los leucotrienos, con importantes funciones en los sistemas circulatorio y nervioso central.

Investigaciones médicas y dietéticas recientes con lípidos estructurados que contienen PUFAs n-3 y n-6 demuestran la potencialidad y el enorme futuro de estos productos. Como ejemplo pueden citarse los trabajos de Kenler y cols. (1996), estos autores suministraron lípidos estructurados con PUFAs n-3 mediante alimentación enteral a pacientes operados de cáncer, comprobando que estos PUFAs se absorbían mejor, dando lugar a menos complicaciones gastrointestinales e infecciones y mejorando las funciones renales y hepáticas. En un segundo estudio observaron que los PUFAs, procedentes de aceites de pescado, disminuyeron las inflamaciones y mejoraron las funciones inmunológicas; estos resultados se atribuyeron a la administración de PUFAs y también a que se suministraron en forma estructurada, lo que facilitó la tolerancia de los pacientes por estos productos. En la tabla 2 se han resumido algunas de las ventajas de la utilización médica o dietética de este tipo de lípidos.

La distribución MLM de los ácidos grasos en la molécula de glicerina facilita el metabolismo de estos lípidos, ya que la lipasa pancreática (1-3 específica) hidroliza los enlaces de las posiciones 1-3 de los triglicéridos, pero esta hidrólisis está facilitada debido a la mayor actividad de esta enzima con los ácidos grasos de cadena media que con los de cadena larga e insaturados. Por tanto, los triglicéridos con ácidos grasos de

cadena media en las posiciones 1, 3 son rápidamente hidrolizados por la lipasa pancreática y absorbidos eficientemente en el interior del sistema porta para suministrar energía de forma inmediata mediante su oxidación en el hígado. Los 2-monoglicéridos (con el ácido graso esencial de cadena larga) son absorbidos en la mucosa intestinal y convertidos de nuevo en triglicéridos, que son transportados a los tejidos extrahepáticos para cumplir sus funciones vitales.

La idea de que los procesos enzimáticos, utilizando lipasas, pueden permitir fabricar lípidos adecuados para cada edad y estado fisiológico, se ha establecido firmemente en la última década, Mukherjee (1990), Quinlam y Moore (1993), Merolli (1997) y Fitch Haumann (1997). Sin embargo, la utilización de lípidos estructurados con ácidos grasos funcionales en posición 2 y ácidos grasos de cadena corta en posiciones 1 y 3 tiene como principal dificultad su alto coste, por lo que su mayor demanda es para productos médicos con un mayor valor añadido.

TABLA 2 Algunos beneficios de los lípidos estructurados.
Aumentan la absorción de los ácidos grasos en la posición 2 de los triglicéridos, por ejemplo el 18:2n-6 en pacientes con fibrosis cística, Ikeda y cols. (1991).
Reducción de las calorías de las grasas, Miller (1995).
Previenen la trombosis; Kennedy (1991).
Mejora de las funciones inmunológicas, Kennedy (1991).
Reducen el riesgo de cancer, Ling y cols. (1991)
Formación de emulsiones de lípidos para alimentación enteral y parenteral, Jensen y Jensen (1992).
Mejoran la absorción de otras grasas, Ikeda y cols. (1991) y Jandacek y cols. (1987).
Reducen los triglicéridos, el LDL colesterol y el colesterol en la sangre, Ikeda y cols. (1991).
Preservan la función del retículo endotelial, Sandstrom y cols. (1993).
Atenuación del catabolismo de las proteinas y mejora del balance de nitrógeno mediante los ácidos grasos de cadena media, Babayan (1987) y Sandstrom y cols. (1993).
Respuesta hipermetabólica a los daños térmicos, Jensen y cols. (1994).

Así pues, el desarrollo de procesos para la producción de lípidos con una estructura definida para tratar determinadas enfermedades o mejorar la salud y el bienestar en general, tiene enormes implicaciones en nutrición y medicina. Cuanto más se sabe sobre las funciones metabólicas de ácidos grasos específicos, mayor es la necesidad de disponer de nuevos lípidos estructurados, dado que ningún nuevo producto es la panacea para todas las enfermedades o condiciones metabólicas. En este sentido, por ejemplo, también tienen interés los lípidos estructurados con ácido palmítico (C16:0) en la posición 2, ya que estos productos parecen influenciar el metabolismo de las lipoproteinas de los niños recien nacidos, de hecho esa es la posición ocupada por un gran porcentaje del ácido pálmitico en la leche humana.

Los lípidos estructurados pueden suponer un salto cualitativo para mejorar la dieta mediante la reducción del consumo de calorías aportadas por las grasas y mediante la mejora en el reparto de los ácidos grasos entre el almacenamiento y la oxidación. También existe la posibilidad de adicionar lípidos estructurados a determinados alimentos para suministrar determinados beneficios para la salud, como por ejemplo

disminuir el riesgo de arteriosclerosis. Sin embargo, para que esto ocurra aun ha de investigarse mucho en la síntesis de estos lípidos estructurados. Todos estos aspectos, así como su utilización en fórmulas infantiles, para pacientes recién operados y para alimentación enteral y parenteral en general, constituyen las mayores aplicaciones y garantizan un mercado enorme para estos productos.

Para terminar este apartado, me gustaría destacar una idea con respecto al futuro de la Tecnología de Alimentos. Es evidente que en los últimos años el desarrollo del nivel de vida en nuestro entorno europeo y la incorporación masiva de la mujer al trabajo, ha determinado que una gran parte de la tecnología culinaria haya pasado a la Industria Alimentaria, con un ahorro importante por economía de escala y multitud de nuevos productos ya preparados o semi-elaborados. Del mismo modo, la mejora de la Sanidad Pública, esta determinando una disminución continua de la mortalidad infantil y un aumento también continuo de la vida media, con una población cada vez más importante correspondiente a la tercera edad. Ambas circunstancias determinan una necesidad creciente de alimentos especiales, no solo precocinados sino también parcialmente predigeridos o con la composición idónea para facilitar su absorción intestinal. A medida que los conocimientos sobre la nutrición humana progresan es posible que siga aumentando no solo la vida media, sino también la calidad de esa vida media y para ello es necesario que la Industria Alimentaria sea capaz de responder con prontitud a los avances en la nutrición humana.

SÍNTESIS DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS POR ACIDOLISIS

La reacción más utilizada para la síntesis de lípidos estructurados es la acidolisis entre triglicéridos naturales ricos en el ácido graso funcional de interés y ácidos grasos de cadena media. Si esta acidolisis se cataliza mediante lipasas 1,3 específicas y por tanto se considera que solo las posiciones 1 y 3 de la glicerina participan en el intercambio puede representarse una molécula de triglicérido por GA_2, siendo A los ácidos grasos nativos que ocupan las posiciones 1 y 3, representando además por X el ácido graso extraño, los cambios que tienen lugar en el proceso de acidolisis considerado vendrán dados por las ecuaciones estequiométricas:



$$GA_2 + X \Leftrightarrow GAX + A$$



$$GAX + X \Leftrightarrow GX_2 + A$$

es decir, los ácidos grasos de cadena media, X, sustituyen a los ácidos grasos nativos, A, tan solo en las posiciones 1 y 3, dando lugar a lípidos estructurados MLM. Las principales dificultades para obtener altos rendimientos en lípidos estructurados por este procedimiento son: disponer de triacilgliceroles con suficiente cantidad del ácido graso funcional de interés en la posición 2, encontrar lipasas 1,3 específicas con una actividad suficientemente alta y desarrollar un método de inmovilización eficaz y evitar las migraciones de grupos acilo desde las posiciones 1 y 3 hasta la posición 2 durante la reacción. Si se pretende que los ácidos grasos funcionales que ocupen la posición 2 sean PUFAs debe partirse de aceites de pescado o de aceites de microalgas marinas.

El Grupo de Investigación de Biotecnología de microalgas marinas de la Universidad de Almería, dirigido por el Profesor Dr. Emilio Molina Grima, mi primer Doctor al incorporarme a la Universidad de Granada, y con el que colaboro en la

actualidad en un Proyecto de Investigación sobre la preparación de lípidos estructurados, se ha dedicado desde su constitución al cultivo interno y externo de microalgas marinas y al desarrollo de procesos para la separación y valorización de todos los componentes de esta biomasa que puedan tener interés desde el punto de vista alimentario ó farmacéutico. El trabajo realizado por el Profesor Dr. Emilio Molina Grima en los últimos 10 años ha sido extraordinario, creando un Grupo compacto de Investigación que lleva a cabo Proyectos Europeos y Nacionales y que es reconocido internacionalmente en el cultivo de microalgas marinas y en el aprovechamiento de los diferentes componentes de su biomasa.

Las microalgas comprenden un grupo muy diverso de microorganismos, incluyendo el fitoplancton marino, que constituyen la fuente primaria de la cadena alimenticia en el mar. Algunas microalgas marinas y otros microorganismos son capaces de sintetizar EPA y/o DHA y pueden contener considerables de estos ácidos grasos, por lo que representan una fuente potencial interesante para la producción comercial de los mismos.

En este sentido, el apreciable contenido en ácidos grasos poliinsaturados, PUFAs, de muchas de las cepas cultivadas, determinó el desarrollo de una línea de investigación para la separación y purificación de estos PUFAs como ácidos grasos libres. Sin embargo, la industria farmacéutica demanda también estos PUFAs como triglicéridos, ya que constituyen la forma más habitual en que se ingieren los lípidos y además se ha demostrado que la eficiencia de su absorción es mayor cuando se suministran de esta forma.

Por este motivo se inició el estudio experimental de la síntesis de triglicéridos ricos en PUFAs mediante catálisis enzimática y en una primera etapa se han obtenido triglicéridos de alto contenido en PUFAs como EPA (20:5n3), AA(20:4n6) y DHA (22:6n3) utilizando extractos de ácidos grasos separados de la biomasa de *Phaeodactylum tricornutum* (de alto contenido en EPA), *Porphyridium cruentum* (de alto contenido en EPA y AA) y de aceite de hígado de bacalao (de alto contenido en EPA y DHA).

Además, como en la actualidad, parecen indudables las grandes ventajas de los triglicéridos estructurados del tipo MLM, con ácidos grasos de cadena media (M) en las posiciones 1 y 3 y un ácido graso de cadena larga (L), funcional, en la posición 2, como medio de suministrar en la dieta componentes energéticos y estructurales en proporción equilibrada, el objetivo final de este Proyecto de Investigación es obtener lípidos estructurados con PUFAs, en la posición 2 de la glicerina, fundamentalmente EPA y DHA procedentes de aceites de pescado o de microalgas y ácido caprílico en las posiciones 1 y 3. La elección de este ácido se ha realizado por ser el de menor peso molecular que aún se considera de cadena media, su volatilidad es suficientemente diferente de la de los ácidos grasos contenidos en los triglicéridos originales, para facilitar su separación, pero no tan alta que plantee problemas de operación en las reacciones de intercambio. Esta obtención se ha planeado, en primer lugar, por el proceso más directo y que parece más fácilmente adaptable a escala industrial: la acidolisis de aceites ricos en PUFAs con ácido caprílico.

Con esta finalidad, se ha seleccionado en primer lugar la lipasa inmovilizada comercial: Lipozyme® IM, de Novo Nordisk A/S, que dada su especificidad 1, 3 ,

parece adecuada para obtener por acidolisis lípidos estructurados del tipo: MLM. Aunque muchos investigadores llevan a cabo estos procesos con los reactivos puros, es decir en ausencia de un solvente orgánico, y es posible que esta sea la forma óptima de llevarlos a cabo a escala industrial, con objeto de poder modificar las concentraciones de los reactivos de forma independiente para el estudio cinético se decidió utilizar n-hexano como solvente orgánico, dado que este disolvente es asequible con gran pureza y muy fácil de separar de los productos de reacción. El n-hexano es suficientemente apolar, tiene un valor de log P de 3,5 y además es inerte y poco tóxico y posee unas propiedades físicas (baja viscosidad, bajo punto de ebullición) que le hacen muy adecuado para su utilización como medio para la reacción de acidolisis catalizada por una lipasa.

También, se decidió trabajar en el intervalo de temperaturas de 30 a 50 °C, para conseguir velocidades de reacción altas sin que tenga lugar de forma apreciable las desnaturalización térmica de la lipasa y disminuyendo al máximo la acil-migración. Para el estudio cinético se ha puesto a punto un reactor continuo, utilizando la lipasa dispuesta en un lecho fijo y haciendo circular a su través la mezcla reaccionante. Dado que las velocidades de estos procesos son relativamente bajas, para poder modificar independientemente la velocidad de circulación por el lecho y el tiempo de residencia se decidió trabajar con recirculación parcial de la salida del lecho al depósito de alimentación.

En la acidolisis de aceite de hígado de bacalao (AHB) con ácido caprílico a 30°C y con una relación molar de 6.13 se llega a alcanzar en el equilibrio una incorporación del 57 % de caprílico, relativamente próxima al máximo teórico del 66.7 %. La composición de los triglicéridos de equilibrio pone de manifiesto que la posición 2 de la glicerina en el AHB esta ocupada fundamentalmente por los ácidos 22:6n3, 20:5n3, 18:1n9 y 16:0.

Por análisis regioespecífico de los triglicéridos obtenidos por HPLC en fase inversa y HPLC de ión plata se ha comprobado que la incorporación de ácido caprílico tiene lugar prácticamente solo en las posiciones 1, 3 de la glicerina, conduciendo a lípidos estructurados del tipo MLM.

Finalmente, quisiera señalar que me siento orgulloso de colaborar en este Proyecto de Investigación con mis antiguos alumnos, los Profesores Drs. Emilio Molina Grima y Alfonso Robles Medina, que con su esfuerzo y dedicación están creando en la joven Universidad de Almería un Grupo de Investigación que, ya hoy día , destaca a nivel internacional en Biotecnología de Microalgas Marinas.

Muchas gracias por escucharme y espero no haberles cansado demasiado.